

La chromatographie

1. Introduction

La chromatographie est une technique analytique essentielle utilisée pour séparer, identifier et quantifier des composés présents dans un mélange complexe. Depuis son développement au début du 20^{ème} siècle, cette méthode a évolué pour devenir un outil incontournable dans de nombreux domaines scientifiques, y compris la chimie, la biologie, la pharmacologie, l'environnement et l'industrie alimentaire.

2. Principe

Le principe fondamental de la chromatographie repose sur la distribution d'un ou plusieurs composants d'un mélange entre deux phases: **une phase stationnaire** (solide ou liquide fixée sur un support) et **une phase mobile** (liquide ou gaz qui traverse la phase stationnaire). Lorsque le mélange est introduit dans le système chromatographique, les différents composants interagissent différemment avec les phases, en fonction de leurs propriétés chimiques et physiques. Cette interaction inégale entraîne une séparation des composants au fur et à mesure de leur migration à travers la colonne chromatographique, permettant ainsi leur identification et leur quantification.

3. Les différents types de techniques chromatographiques

En fonction de la phase mobile, les techniques de chromatographie peuvent généralement être divisées en deux grandes classes:

- La chromatographie en phase gazeuse (**C.G.E**): la phase mobile est un gaz tel que l'hélium.
- La chromatographie en phase liquide (**C.G.L**): la phase mobile est un liquide tel que le PBS.

Dans les deux classes, la phase stationnaire peut être liquide ou solide.

✚ Nous sommes intéressées de savoir trois type de chromatographie:

3.1. La chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion (**CES**), également appelée chromatographie par taille ou chromatographie d'exclusion, est une technique de séparation qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Elle est particulièrement utile pour l'analyse de biomolécules telles que les protéines, les polysaccharides et les polymères.

Le principe fondamental de la **CES** repose sur l'interaction des molécules avec une phase stationnaire poreuse, généralement constituée de billes de gel ou de polymères ayant des pores de tailles spécifiques:

Phase Stationnaire: La phase stationnaire est composée de billes de gel qui contiennent des pores de tailles variées. La taille des pores détermine les molécules qui peuvent passer à travers la phase stationnaire. Les molécules plus grandes ne peuvent pas pénétrer dans les pores et sont donc exclues (les molécules sont éluées plus rapidement car elles ne seront pas retenues dans la matrice), tandis que les molécules plus petites peuvent entrer et sortir des pores (les molécules incluses dans les pores resteront plus longtemps dans la phase stationnaire avant l'éluion) (**Figure 1**).

Phase Mobile: La phase mobile est généralement un tampon ou un solvant qui transporte les échantillons à travers la colonne chromatographique. Les molécules sont séparées en fonction de leur taille, les plus petites étant retenues plus longtemps dans la colonne car elles peuvent accéder aux pores et passer plus de temps dans la phase stationnaire.

Séparation: Les molécules sont séparées en fonction de leur taille, avec les plus grandes sortant de la colonne en premier, suivies des molécules plus petites. Ce processus permet de fractionner le mélange en plusieurs fractions en fonction de la taille.

3.1.1. Avantages et Inconvénients:

Les avantages de la technique sont:

- **Non-destructive:** La **CES** ne modifie pas les échantillons, ce qui est crucial pour l'analyse des biomolécules.
- **Sélectivité:** Elle offre une séparation basée uniquement sur la taille, ce qui peut être avantageux pour des mélanges complexes.
- **Simplicité:** La méthode est relativement simple à mettre en œuvre et à interpréter.

Les inconvénients de la technique sont:

- **Sensibilité à la Conformation:** La forme des molécules peut affecter la séparation, ce qui peut rendre l'interprétation plus complexe.
- **Limites de Taille:** Les colonnes ont des limites de taille pour les molécules qu'elles peuvent analyser efficacement.

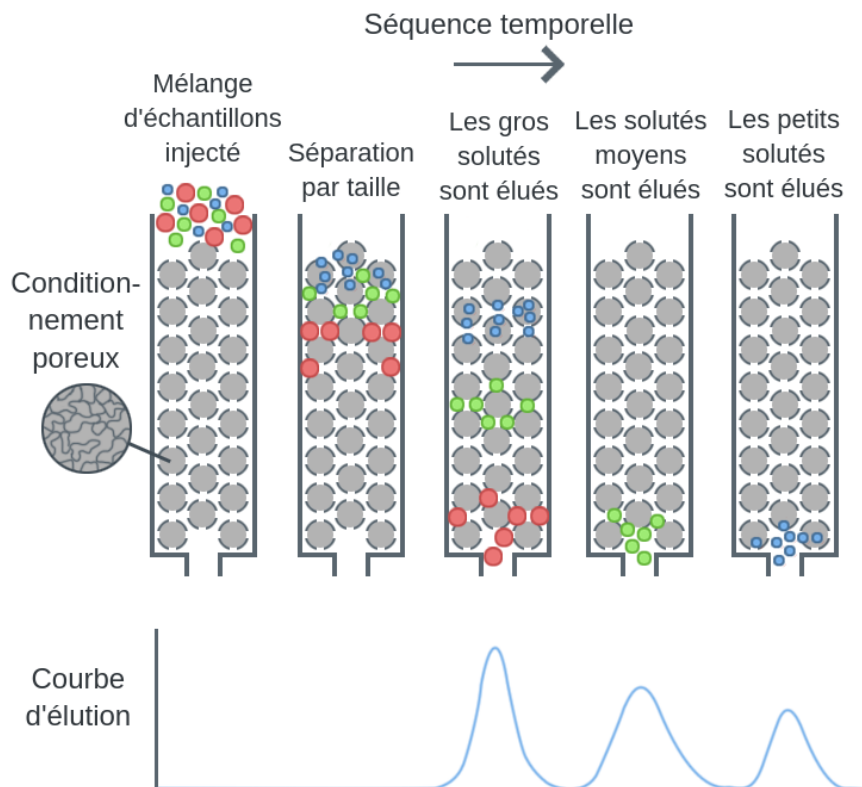


Figure 1: Chromatographie d'exclusion

3.2. Chromatographie d'Échange d'Ions

La chromatographie d'échange d'ions (**CEI**) est une technique analytique et de séparation utilisée pour séparer des ions et des molécules polaires en fonction de leur charge. Elle est largement utilisée dans divers domaines, notamment la chimie, la biochimie, la biotechnologie et l'analyse environnementale, pour l'analyse et la purification de protéines, d'acides nucléiques, d'acides aminés et de petites molécules ioniques. Par exemple, les acides aminés des protéines contiennent des groupes chimiques chargés positivement et négativement. Les protéines peuvent porter une charge nette positive ou négative, voire aucune charge, en fonction du pH de leur environnement.

Le pH où la protéine n'a pas de charge est appelé point isoélectrique (**pH_i**). Par conséquent, le choix du pH du tampon détermine la charge nette de la protéine en question. Si le pH du tampon est supérieur au point isoélectrique de la protéine, celle-ci portera une charge négative nette. En revanche, s'il est inférieur, la protéine portera une charge positive nette.

La phase stationnaire doit être sélectionnée selon la charge nette des molécules à séparer. De plus, comme les échantillons sont des mélanges de différents composés qui ont des charges différentes, un gradient de tampon est normalement utilisé pour éluer chaque composé différent séparément (**Figure 2**).

Le principe fondamental de la **CEI** repose sur l'interaction électrostatique entre les ions d'un échantillon et les groupes fonctionnels chargés fixés sur la phase stationnaire:

Phase Stationnaire: La phase stationnaire est généralement constituée de résines ou de gels contenant des groupes fonctionnels chargés (positifs ou négatifs). Ces groupes peuvent se lier à des ions de charge opposée présents dans la phase mobile.

Échangeurs de Cations: Contiennent des groupes chargés négativement (par exemple, sulfonates) qui échangent des cations (ions positifs) de l'échantillon.

Échangeurs d'Anions: Contiennent des groupes chargés positivement (par exemple, ammonium quaternaire) qui échangent des anions (ions négatifs).

Phase Mobile: La phase mobile est généralement une solution tampon qui transporte les ions à travers la colonne chromatographique. La composition du tampon (pH, force ionique, etc.) peut être ajustée pour optimiser la séparation.

Séparation: Lorsque le mélange d'échantillons est introduit dans la colonne, les ions interagissent avec la phase stationnaire en fonction de leur charge et de leur affinité pour les groupes fonctionnels. Les ions ayant une plus forte affinité pour la phase stationnaire sont retenus plus longtemps, tandis que ceux avec une affinité plus faible passent plus rapidement à travers la colonne. Cette différence de vitesse entraîne la séparation des composants de l'échantillon.

3.2.1. Avantages et Inconvénients:

Les avantages de cette technique sont:

- **Sélectivité Élevée:** La **CEI** permet de séparer des ions ou molécules avec des charges similaires mais des affinités différentes.
- **Applications Variées:** Utile dans de nombreux domaines, allant de la recherche fondamentale à l'industrie pharmaceutique.
- **Non-destructive:** La méthode ne modifie pas les échantillons, ce qui est essentiel pour les analyses ultérieures.

Tandis que, les inconvénients sont:

- **Dépendance au pH:** La séparation est fortement influencée par le pH du tampon, ce qui peut nécessiter des ajustements pour optimiser les conditions de séparation.
- **Compétition des Ions:** Les ions présents dans le tampon peuvent interférer avec la séparation, ce qui nécessite une planification minutieuse de la composition de la phase mobile.
- **Limitation de Capacité:** Les colonnes peuvent avoir une capacité limitée pour des échantillons très concentrés, entraînant des pics de surcharge.

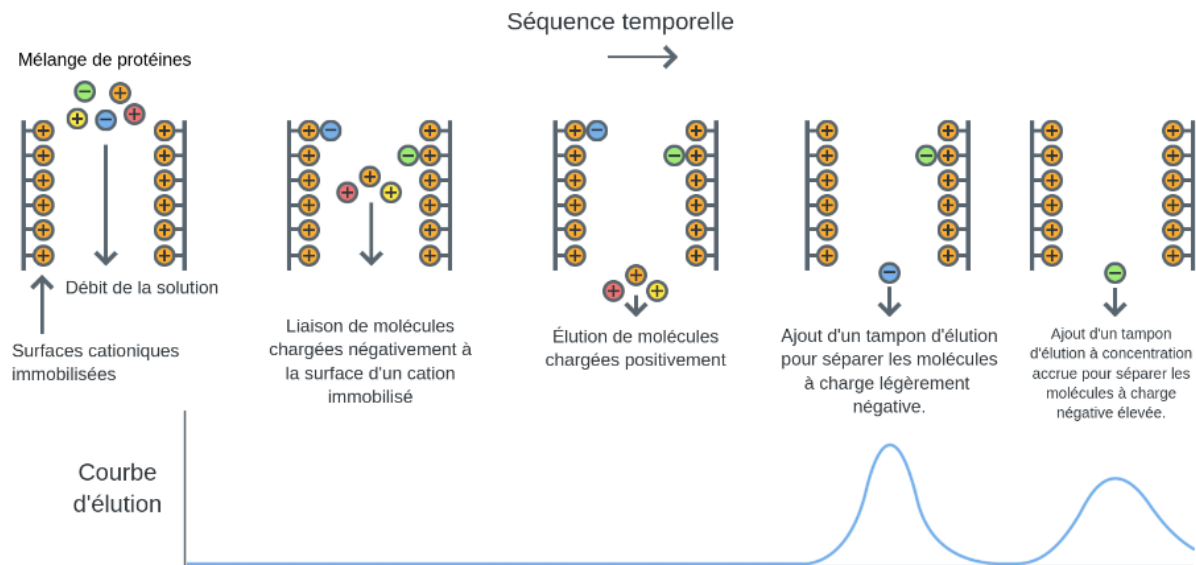


Figure 2: Chromatographie d'échange d'ion

3.3. La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (**HPLC**) est une technique analytique sophistiquée utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange complexe. Elle est largement utilisée dans divers domaines, notamment la chimie, la biochimie, la pharmacologie, l'industrie alimentaire et l'analyse environnementale. Cette technique est une évolution de la chromatographie sur colonne en phase liquide.

Le principe fondamental de la **HPLC** repose sur la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile :

Phase Stationnaire: La phase stationnaire est généralement constituée de particules solides ou de gels, souvent en silice, recouvertes de groupes fonctionnels spécifiques. La nature de la phase stationnaire peut varier en fonction des propriétés des composés à analyser (par exemple, hydrophobe, polaire, etc.).

Phase Mobile: La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui transporte le mélange à travers la colonne. La composition de la phase mobile est souvent soigneusement choisie pour optimiser la séparation des composants.

Pression : Les échantillons sont introduits dans la colonne à haute pression (généralement de 50 à 400 bars), ce qui permet aux composés de passer à travers la phase stationnaire rapidement et de manière efficace.

Séparation: Lorsque le mélange est injecté, les différents composés interagissent différemment avec la phase stationnaire et la phase mobile, entraînant leur séparation. Les composés ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire migrent plus lentement, tandis que ceux ayant une plus grande affinité pour la phase mobile passent plus rapidement. Pour améliorer la séparation, il faut que la phase stationnaire soit de microparticule et que la pression de pompage soit élevée.

3.3.1. Équipements de HPLC:

Un appareil de HPLC typique (**Figure 3**) se compose de plusieurs éléments importants. Ces composants ont des fonctions spécifiques et ont besoin les uns des autres pour que nous puissions mener à bien une expérience de HPLC.

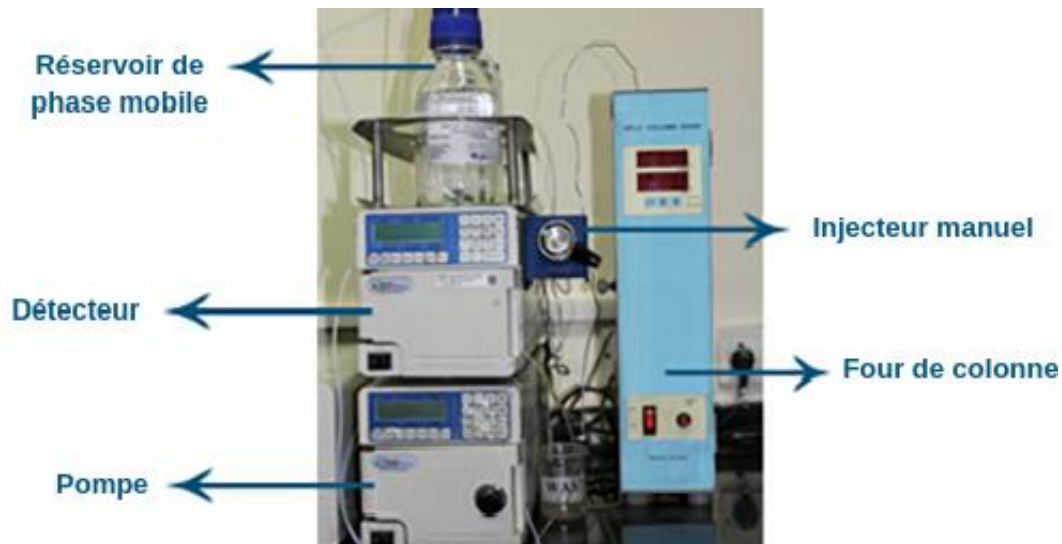


Figure 3: Un appareil de HPLC typique

Les principaux composants de l'appareil de **HPLC** sont énumérés ci-dessous :

Le réservoir de la phase mobile: C'est l'endroit où est contenue la phase mobile. La phase mobile est normalement stockée dans des bouteilles en verre.

Les pompes: La fonction de la pompe est de créer une haute pression et de créer un flux de phase mobile dans le système, contient un système de gradient en mode isocratique ou en mode gradient.

L'injecteur d'échantillon: C'est l'endroit où l'échantillon est introduit dans le système. L'échantillon doit être sous forme liquide (solution). Elle est soit manuelle, soit automatique.

La colonne: C'est ici que la séparation de l'échantillon a lieu. La colonne est un tube en acier remplie de billes que l'on appelle phase stationnaire. Sa taille et sa composition varient en fonction des analyses.

Le four régulateur: C'est là que la colonne est conservée et que la température peut être contrôlée.

Le détecteur: C'est là que les analytes séparés sont identifiés et quantifiés par mesure de la concentration des composés au fur et à mesure qu'ils sortent de la colonne. Les détecteurs courants incluent les détecteurs UV-Vis, de fluorescence et de conductivité.

Système de Contrôle et d'analyse: Un ordinateur ou un logiciel est souvent utilisé pour contrôler le système et analyser les données, générant des chromatogrammes pour l'interprétation.

3.3.2. Types de HPLC:

HPLC Normale: Utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile apolaire. Elle est utilisée pour séparer des composés polaires.

HPLC Inverse: Utilise une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire. C'est la forme la plus courante de **HPLC**, idéale pour séparer des composés hydrophobes.

HPLC à Gradient: La composition de la phase mobile change progressivement pendant l'analyse pour améliorer la séparation des composés.

HPLC à Flux Élevé: Utilise des colonnes à particules plus petites et des pressions plus élevées pour obtenir des séparations plus rapides et plus résolues.

3.3.3. Avantages et Inconvénients:

Les avantages sont:

- **Résolution Élevée:** La **HPLC** peut séparer des composés très similaires avec une excellente résolution.
- **Rapidité:** Les analyses peuvent être effectuées rapidement, souvent en quelques minutes.
- **Flexibilité:** La méthode peut être adaptée à une large gamme de composés en changeant la phase stationnaire et mobile.

Tandis que les inconvénients :

- **Coût Élevé:** Les équipements et les réactifs peuvent être coûteux.
- **Complexité:** L'interprétation des résultats peut nécessiter des compétences techniques.
- **Maintenance:** Les systèmes **HPLC** nécessitent une maintenance régulière pour assurer un fonctionnement optimal.

4. Les fondements théoriques de la chromatographie

a) Notions de temps:

Soit la séparation d'un constituant, un des paramètres les plus importants en chromatographie sur colonne est le temps de rétention ou (volume de rétention).

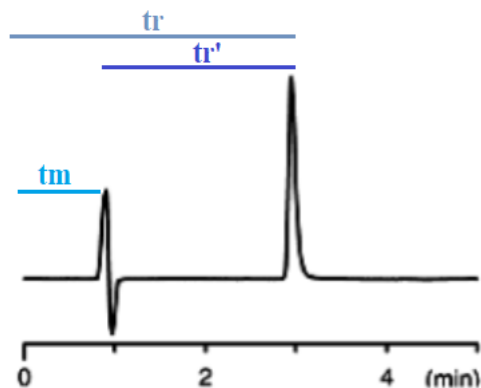


Figure 4: Tracé représentatif des constituants en fonction du temps

t_m (temps mort): C'est le temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne.

t_r (temps de rétention): C'est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir et traverser le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne.

t_r' (temps de rétention réduit): C'est le temps passer par le soluté dans la phase stationnaire
 $t_r' = t_r - t_m$.

b) Facteur de rétention ou de capacité K:

Il s'exprime par le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile.

$$K = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

c) Le nombre de plateau théorique N:

C'est un paramètre qui sert à mesurer la performance ou l'efficacité.

$$N = \frac{L}{H}$$

d'où ; L : longueur de la colonne en cm.

H : la hauteur équivalente à un plateau théorique.

L'efficacité augmente avec l'augmentation du nombre de plateau théorique N et la diminution de la hauteur équivalente H .

Il est souhaitable que le passage d'une substance de la phase mobile ait la phase stationnaire et inversement se fasse sur la distance la plus courte possible, le nombre de fois que ce phénomène se produit correspond à un plateau théorique.

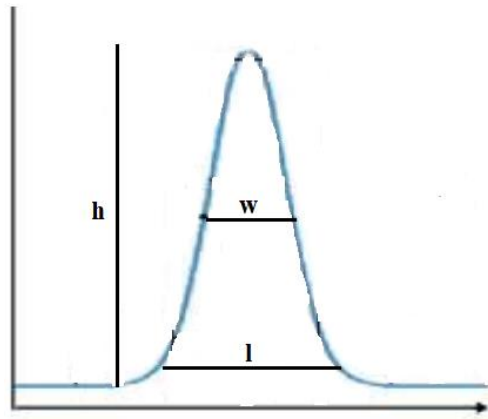
On a:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{l}\right)^2$$

l : largeur du pic à la base.

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

w : largeur du pic à mi-hauteur.



d) Facteur de sélectivité α :

Ce facteur de séparation est exprimé par la relation:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{tr_2 - tm}{tr_1 - tm} = \frac{tr'_2}{tr'_1}$$

K_1 : Facteur de capacité du composé 1.

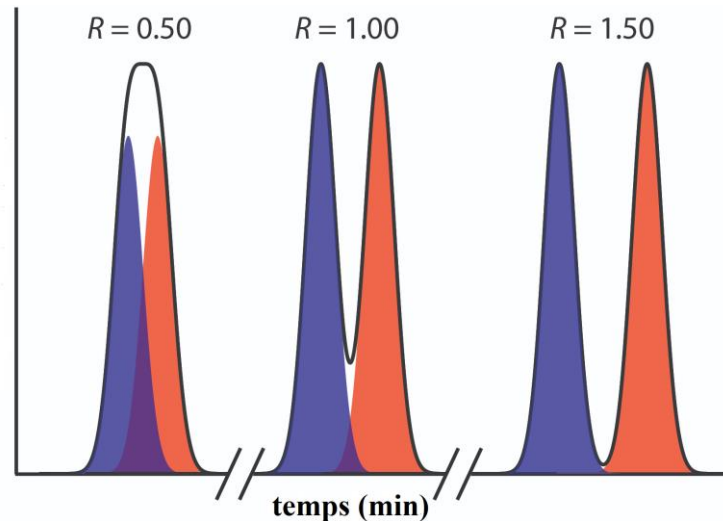
K_2 : Facteur de capacité du composé 2.

Remarque: Si: $\alpha=1$ pas de résolution.

e) Résolution des pics R:

La résolution est une mesure de la qualité de séparation on l'a note R.

Soit la figure suivante:



- En pratique une bonne résolution suppose que $R \geq 1,5$.

5. Conclusion

Ces techniques chromatographiques offrent aux microbiologistes des moyens puissants pour explorer la diversité biologique, caractériser les produits métaboliques et améliorer les applications biotechnologiques. Leur intégration dans la recherche microbiologique contribue à des avancées significatives dans la compréhension des microorganismes, leur rôle dans l'écosystème et leur potentiel pour des applications industrielles et cliniques.